

УДК 57.053

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ КАЛЬЦИЕВОГО ОТВЕТА В СПЕРМАТОЗОИДАХ ЧЕЛОВЕКА И МЫШИ

© 2024 г. Ю. Д. Коробкина^{a, *}, М. А. Пантелеев^{a, b, c}, А. Н. Свешникова^{a, b, c}

^aЦентр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, 109029 Россия

^bМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

^cНациональный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Москва, 117198 Россия

*e-mail: juliajessika@gmail.com

Поступила в редакцию 09.10.2023

После доработки 10.12.2023

Принята к печати 13.12.2023

Кальциевая сигнализация — один из ключевых способов трансдукции сигнала в клетках невозбудимых тканей. Кальциевая сигнализация как в сперматозоидах мыши, так и в сперматозоидах человека индуцируется в ответ на прогестерон, реализуется в виде осцилляций или одиночных пиков, а также приводит к акросомной реакции, но молекулярные механизмы существенно отличаются между видами.

Целью данной работы является сравнительное исследование механизмов кальциевой сигнализации при физиологической активации в сперматозоидах человека и мыши. В рамках данной работы мы изучили кальциевый ответ в сперматозоидах мыши, активированных прогестероном. С помощью спектрофлуориметрии впервые было количественно оценено увеличение концентрации кальция в ответ на прогестерон в меченых Fura-2 сперматозоидах мыши в суспензии. Было показано, что сперматозоиды мышей реагируют на 50 мкМ прогестерон пиком шириной 120 ± 35 с и высотой 0.8 ± 0.3 мкМ, и этот ответ блокируется аспирином. На основе литературных данных была построена схема индукции кальциевой сигнализации, предполагающая промежуточный этап с синтезом некоторого простааноида (возможно, PGE₂) и активацией сперматозоида мыши данным простаноидом через ассоциированный с G-белком рецептор. Используя полученную схему реакций были разработаны две вычислительные модели: точечная модель и трехмерная модель. Как и в случае сперматозоидов человека, точечная модель дала только качественное описание кальциевых ответов, в то время как трехмерная модель позволила получить близкие к эксперименту параметры пика и частоту осцилляций концентрации кальция в ответ на прогестерон. С помощью анализа *in silico* показано, что в сперматозоидах мыши пространственное распределение сигнальных ферментов регулирует тип и форму кальциевого ответа.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что наличие временных задержек, обусловленных диффузией и пространственным распределением ферментов сигнализации кальция, регулирует кальциевый ответ как в сперматозоидах человека, так и в сперматозоидах мыши.

Ключевые слова: кальциевая сигнализация, внутриклеточная сигнализация, компьютерное моделирование, прогестерон

DOI: 10.31857/S0233475524030086, **EDN:** crzabj

ВВЕДЕНИЕ

Кальциевая сигнализация — один из ключевых способов трансдукции сигнала в эукариотических клетках. Устройство кальциевой сигнализации в одних и тех же клетках многих организмов сходно [1, 2], поэтому сравнение механизмов кальциевой сигнализации между организмами может помочь определить особенности устройства данной системы.

В сперматозоидах млекопитающих динамика кальция контролирует большинство процессов

оплодотворения, например, акросомную реакцию, капацитацию и гиперактивацию [3, 4]. В сперматозоидах мыши и человека кальциевый ответ может быть индуцирован стероидным гормоном прогестероном, присутствующим в женских половых путях [5]. В человеческих сперматозоидах прогестерон опосредованно активирует расположенный в жгутике сперматозоида кальциевый канал CatSper [6], который в покое ингибирован липидом мембраны 2-арахидоноилглицеролом

(2-AG). Прогестерон активирует локализованную в жгутике гидролазу ABHD2, катализирующую расщепление 2-AG на арахидоновую кислоту и глицерин [6]. Расщепление 2-AG приводит к активации CatSper и поступлению кальция в клетку. Повышение концентрации кальция способно активировать фермент фосфолипазу C δ (PLC δ 4), имеющуюся в сперматозоидах [7, 8]. Фосфолипаза C катализирует образование инозитол-1,4,5-трифосфата (IP $_3$) из мембранных фосфоинозитидов. IP $_3$ активирует канал-рецептор к IP $_3$ (IP $_3$ R), расположенный на мембране депо кальция в клетке, роль которого в сперматозоиде человека играет производное ядра – избыточная ядерная мембрана (RNE), и, таким образом, индуцирует высвобождение кальция в цитоплазму клетки через эти канал-рецепторы [9, 10]. Как у человека, так и у мыши кальциевые АТФ-азы далее удаляют кальций из цитозоля: АТФ-аза плазматической мембраны (PMCA), присутствующая в мембране жгутика [11], выкачивает кальций во внеклеточную среду, а АТФ-аза секреторного пути (SPCA), присутствующая на мембране кальциевого депо, переносит кальций из цитозоля в кальциевое депо [12]. Дополнительно присутствующие кальциевые буферы, такие как кальмодулин (CaM) [13], расположенный в цитозоле, и кальретикулин (CalRet) [14], расположенный в депо, способны обратимо связывать кальций и модулировать ответ клетки. Данная сигнализация может приводить как к осцилляторному кальциевому ответу, так и к ответу типа “одиночный пик”. Ранее нами было показано [15], что тип кальциевого ответа в сперматозоидах человека на прогестерон зависит от пространственного расположения ферментов и каналов, управляющих кальциевой сигнализацией.

Несмотря на то что кальциевая сигнализация в сперматозоидах мыши обладает теми же свойствами, что и у человека, а именно, кальциевая сигнализация индуцируется в ответ на прогестерон, реализуется в виде осцилляций или одиночных пиков и индуцирует акросомную реакцию, ее молекулярные механизмы существенно отличаются [16]. Описанный выше механизм не работает так же, так как в сперматозоидах мыши содержание 2-AG недостаточно высоко для его реализации, CatSper нечувствителен к прогестерону, а ABHD2 расположена в мембране акросомы (органелла, находящаяся в передней части головки сперматозоида), а не в жгутике [6]. Также известно, что кальциевым депо в сперматозоиде мыши является акросома, а не избыточная ядерная мембрана [17]. Точный механизм прогестероновой активации сперматозоидов мыши

не установлен. Известно, что арахидоновая кислота способна индуцировать акросомную реакцию в том же объеме, что и прогестерон [18], в ходе активации генерируется простагландин E2 (PGE2) [19], который способен запускать акросомную реакцию [20], а мышинный канал CatSper, наоборот, нечувствителен к простагландинам и прогестерону [21]. При этом показано, что в индукции акросомной реакции прогестероном участвуют G-белки и некоторая изоформа фосфолипазы C [18], при этом конкретный рецептор, сопряженный с G-белком (GPCR), не установлен.

В настоящей работе мы предполагаем, что активация сперматозоидов мыши прогестероном происходит по следующему механизму (рис. 1). Прогестерон, свободно проникая через плазматическую мембрану, активирует находящуюся на акросоме ABHD2 (возможен также вклад фосфолипазы A2, но с точки зрения модели это не вносит качественных изменений), что приводит к генерации арахидоновой кислоты и ее трансформации циклооксигеназным путем в PGE2 (или другой простаноид). Хотя у мыши есть активные рецепторы к PGE2, в том числе EP1 [22], данные об их наличии и локализации в сперматозоидах найдены не были. Есть данные, что на акросоме сперматозоидов мыши локализован рецептор к эстрогену (GPER), который относится к тому же классу рецепторов, что и EP1 [23]. В работе мы предполагали, что простаноид (PGE2) активирует GPCR (EP1), находящийся на плазматической мембране в районе акросомы, так как в жгутике сперматозоида мыши нет достаточного количества фосфоинозитидов для работы PLC [24]. Далее с активной α q-субъединицей G-белка ассоциируется PLC β 1 [25], и кальциевая сигнализация индуцируется по пути, описанному выше для сперматозоида человека, с тем отличием, что кальциевым депо является акросома, а не избыточная ядерная мембрана. Также учитывается, что в сперматозоидах мыши кроме PLC β 1 находится PLC δ 4 [26].

В настоящей работе мы показываем, что предложенная схема событий внутриклеточной сигнализации позволяет описать наблюдаемые кальциевые ответы сперматозоидов мыши на прогестерон.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Fura-2-AM, Fura-RED-AM (Molecular Probes, США); прогестерон, DMSO, CaCl $_2$, KCl, MgCl $_2$, NaH $_2$ PO $_4$, NaHCO $_3$, БСА, Triton, EDTA, глюкоза (Sigma-Aldrich, США), аспирин (Bayer, Германия).

Экспериментальное наблюдение кальцевой активации в сперматозоидах мыши. Данное исследование было одобрено комиссией по биоэтике МГУ им. М.В. Ломоносова (номер заявки 109-ж от 06 марта 2022 года), и оно было проведено в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации. У умерщвленных методом цервикальной дислокации мышей вырезался придаток яичка. Производилось несколько глубоких надрезов на придатке яичка, далее в течение 10 мин сперматозоиды выплывали наружу. С краев капли собиралось 10 мкл буфера, содержащего сперматозоиды, далее сперматозоиды разбавлялись буфером Tyrode's (134 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.05 mM MgCl₂, 417 мкМ NaH₂PO₄, 11.9 mM NaHCO₃, 5.5 mM глюкоза). После добавления Fura-2 в концентрации 2 мкМ производилась инкубация при 37°C в течение 45 мин. Далее капли буфера объемом 100 мкл наносились на чашку Петри, через 10 мин 10 мкл буфера со сперматозоидами собиралось с краю капли и ресуспендировалось в 90 мкл Tyrode's без добавления кальция на каплю.

Экспериментальное наблюдение прогестероновой активации окрашенных флуоресцентной меткой на кальций Fura-2 мышинных сперматозоидов производилось с помощью спектрофлуориметра. Возбуждение Fura-2, не связавшейся с кальцием, производилось на длине волны 380 нм, возбуждения Fura-2, связавшейся с кальцием, производилось на длине волны 340 нм. В ходе измерений в суспензию клеток добавлялся CaCl₂ до концентрации 2 мМ для определения базового уровня сигнала [27]. Далее в суспензию добавлялся прогестерон в концентрации 50 мкМ. В части экспериментов перед добавлением прогестерона сперматозоиды инкубировались с аспирином в концентрации 100 нг/мл в течение 5 мин. Аспирин в высокой дозе добавлялся для уточнения предложенной схемы активации сперматозоидов мыши прогестероном, так как в данном случае он является ингибитором обеих изоформ циклооксигеназы [28]. Для окрашенных Fura-2 клеток далее проводился пересчет относительного изменения флуоресценции в концентрации кальция по следующей формуле [29]:

$$[Ca^{2+}] = K_d \frac{F_{380max} - F_{380back}}{F_{380max} - F_{340back}} \left(\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right). \quad (1)$$

Здесь K_d — константа диссоциации комплекса кальция и Fura-2, R — отношение интенсивности флуоресценции при возбуждении лазером с длиной волны $\lambda=340$ нм (связавшейся с кальцием краски)

к интенсивности флуоресценции при $\lambda=380$ нм (не связавшейся с кальцием краски). F_{max} и F_{min} — максимальная и минимальная флуоресценции при возбуждении данной длиной волны, F_{back} — флуоресценция фона, R_{min} и R_{max} — отношения интенсивностей при максимально и минимально возможных концентрациях кальция в клетке. Для определения данных коэффициентов R_{min} и R_{max} была проведена следующая калибровка: для измерения максимально возможного отношения флуоресценций R_{max} к сперматозоидам в конце каждого эксперимента добавлялся детергент Triton. Для того чтобы измерить R_{min} , после добавления Triton в среду с клетками добавлялся кальцевый хелатор EDTA. После каждого добавления подвижность и морфология сперматозоидов в суспензии проверялась на микроскопе ЛОМО Микмед-6 в режиме темного поля.

Обработка изображений проводилась с помощью Fiji (<https://imagej.net/>). Визуализация данных производилась с помощью GraphPad Prism 8 (<https://www.graphpad.com/>).

Построение математической модели. На основе литературных данных о кальцевой сигнализации в сперматозоидах млекопитающих нами построены две вычислительные модели прогестерон-индуцированной кальцевой сигнализации в сперматозоидах мыши, а именно точечная модель и трехмерная модель. Точечная модель представляет собой систему 23 обыкновенных дифференциальных уравнений, управляемую 49 параметрами и интегрируемую методом LSODA [30] с максимальным количеством внутренних шагов 10^4 , абсолютной погрешностью 10^{-12} , относительной погрешностью 10^{-7} , с помощью программного пакета COPASI (<https://copasi.org/>) [31]. Трехмерная модель представляет собой систему дифференциальных уравнений в частных производных и обыкновенных дифференциальных уравнений, интегрируемую методом конечных объемов с максимальным шагом по времени 0.01 с, пространственным шагом 0.1 мкм, абсолютной погрешностью 10^{-9} , относительной погрешностью 10^{-7} , реализованным в программном пакете VCell (<https://vcell.org/>) [32].

Уравнения модели, граничные условия и значения параметров приведены в Дополнении 1. Для каждого мобильного буфера рассматривается вклад двух некооперативных сайтов: сайтов С и Р для кальретикулина и С и N для кальмодулина [33]. Активацию G-белка мы описываем согласно модели Катанаева и соавт. [34]. Детали построения и валидации моделей для сперматозоида человека даны в работе [15]. Модель была разбита на два модуля.

В первом модуле описывается цепочка биохимических реакций от активации AVHD2 прогестероном до активации PLC β . Второй модуль модели описывает динамику внутриклеточного кальция и IP $_3$.

В трехмерной модели учитывается диффузия ионов кальция, IP $_3$, CaM и других веществ, и пространственная локализация ферментов и каналов. В точечной модели по сравнению с трехмерной были изменены параметр $k_{PLC} = 180 \text{ с}^{-1}$ для предотвращения самопроизвольной кальциевой активации фосфолипазы (при высоком значении константы стационарное состояние модели соответствовало опустошенному депо); для исследования режимов использовались также другие значения. С точки зрения сопоставления моделей, физический смысл уменьшения константы связан с уменьшением концентраций ряда веществ (начиная с IP $_3$) в месте их действия по сравнению с местом производства.

Предполагаемая схема модели показана на рис. 1. Первый модуль модели состоит из 11 уравнений, описывающих активацию фосфолипазы C прогестероном. В модуле были использованы значения для режима № 4 из модели Катанаева [34]. Для оценки адекватности выбора использовались экспериментальные данные [35]. Далее была использована теорема Тихонова [36] для частичной редукции модели (см. Дополнение).

Второй модуль модели состоит из 8 уравнений, описывающих кальциевую сигнализацию в сперматозоиде мыши в ответ на активацию PLC β . С целью обеспечения независимого исследования модулей на вход модели подавалась активность PLC β на мембране в головке и шейке, аппроксимированная из первого модуля модели. Несмотря на то что мы для полноты картины учли в модели фосфолипазу PLC $\delta 4$, также способную в принципе давать колебания через наличие положительной обратной связи, период этих колебаний слишком сильно отличается, и такая возможность не является значимой для целей данного исследования. Далее для второго модуля также была использована теорема Тихонова для частичной редукции модели (см. Дополнение).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Кальциевый ответ на активацию прогестероном в сперматозоидах млекопитающих. В ходе экспериментов было показано, что мышинные сперматозоиды активируются прогестероном в суспензии в концентрации 50 мкМ с шириной кальциевого пика $120 \pm 35 \text{ с}$ (средние $\pm \text{SD}$) и высотой $0.8 \pm 0.3 \text{ мкМ}$

относительно базового уровня кальция, в то время как одиночные сперматозоиды человека — в концентрации 5 мкМ с шириной $160 \pm 44 \text{ с}$ и высотой $0.5 \pm 0.2 \text{ мкМ}$ или кальциевыми осцилляциями с периодом порядка сотен секунд (рис. 2). Характерная ширина определяется как ширина пика на высоте пика 10% от максимальной амплитуды. В силу усреднения ответа по всем клеткам при измерении уровня кальция в суспензии, в наших экспериментах не наблюдался осцилляторный ответ в сперматозоидах мыши, при этом в литературе присутствуют данные об осцилляторных ответах в ответ на прогестерон [35], однако характерные концентрации кальция в сперматозоидах мыши ранее не измерялись. Также произведены эксперименты с добавлением аспирина к сперматозоидам мыши. Показано, что кальциевый ответ на прогестерон отсутствует в сперматозоидах мыши при пятиминутной преинкубации с 100 нг/мл аспирина (рис. 2б). Это подтверждает предложенную схему активации сперматозоида прогестероном.

Трехмерная, но не точечная модель предоставила количественное описание кальциевого ответа, индуцированного прогестероном в сперматозоидах мыши. Для описания полученных экспериментальных результатов по индуцированной прогестероном кальциевой сигнализации в сперматозоидах мыши, мы использовали сначала точечную, а потом трехмерную модели (см. Материалы и методы).

Для описания экспериментально наблюдаемых откликов кальция (рис. 2) в модуле модели, описывающем кальциевый ответ, варьировалась каталитическая константа фосфолипазы C (k_{PLC}). Обоснование изменения k_{PLC} заключалось в том, что в образце спермы, инкубированном в капацитирующих условиях, присутствуют как минимум две субпопуляции сперматозоидов [37], различающиеся по своему мембранному потенциалу, влияющему на активность потенциал-чувствительной фосфатазы (VSP) [24], регулирующей концентрацию фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфата (PIP $_2$) в сперматозоидах.

Точечная модель прогестерон-индуцированной кальциевой сигнализации в сперматозоидах человека была способна качественно описать как осцилляторный ответ (рис. 3д), так и одиночный пик (рис. 3б). Однако в случае сперматозоидов человека, максимальная ширина пика, описываемая одномерной моделью, составляет 40 с, а максимальный период осцилляций — 50 с (максимумы, полученные в серии запусков с варьированием параметров при условии высоты пика не более 1.5 мкМ).

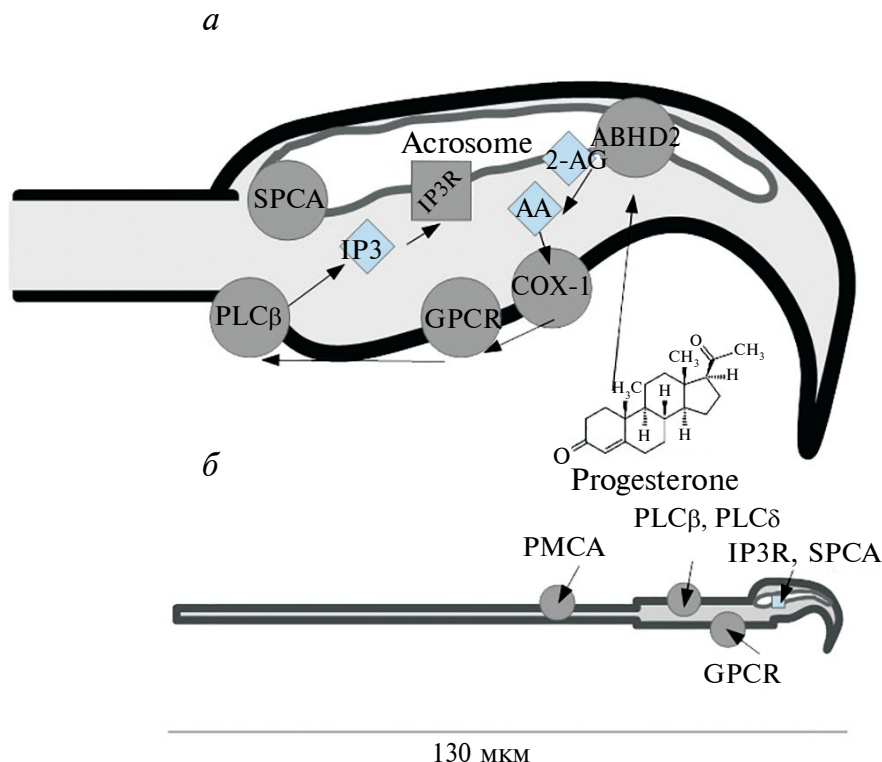


Рис. 1. Предполагаемая схема кальциевой активации сперматозоидов мыши прогестероном. *а* – Общая схема реакций. ABHD2 активируется прогестероном и расщепляет 2-арахидоноилглицерол (2-AG) до арахидоновой кислоты (AA) и глицерина. Арахидоновая кислота трансформируется присутствующей в сперматозоидах мыши циклооксигеназой-1 (COX-1) в некоторый простаноид (возможно, PGE₂), активирующий ассоциированный с G-белком рецептор (GPCR). На рисунке GPCR изображен на плазматической мембране, но в модели он также мог находиться на мембране акросомы. Далее происходит активация фосфолипазы Cβ (PLCβ), катализирующей производство инозитол-1,4,5-трифосфата (IP₃), активирующего каналы-рецепторы к IP₃ (IP₃R), расположенные в мембране внутриклеточного хранилища кальция в сперматозоиде (акросомы). *б* – Схема пространственного распределения компонентов системы. В настоящей работе предполагалось, что АТР-аза плазматической мембраны (PMCA) в сперматозоидах мыши активна в жгутике сперматозоида, производство IP₃ локализовано в шейке и головке сперматозоида, а IP₃R и АТР-аза секреторного пути (SPCA) локализованы в мембране акросомы.

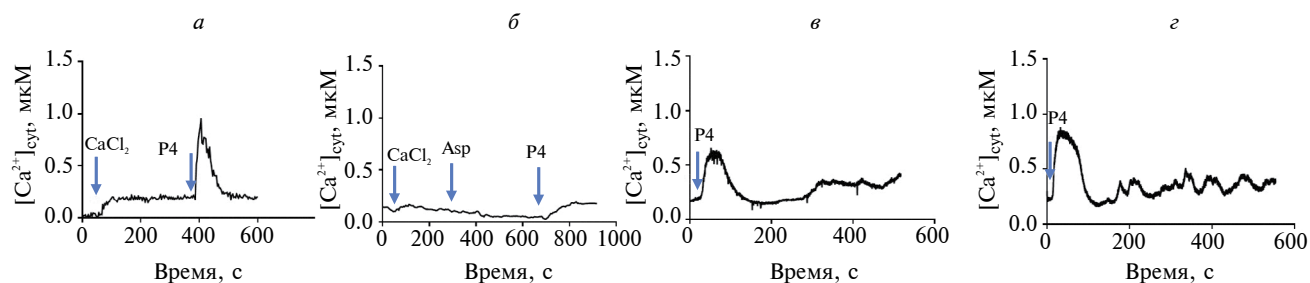


Рис. 2. Кальциевый ответ на активацию прогестероном в сперматозоидах млекопитающих. *а* – Типичный кальциевый ответ суспензии сперматозоидов мыши в ответ на активацию 50 мкМ прогестероном с характерным временем активации и ответа 120 ± 35 с (среднее $\pm$ SD). Стрелкой указаны времена добавления CaCl₂ прогестерона (P4). Общее количество экспериментов для P4: $N = 3$. *б* – Типичный ответ на прогестерон при преинкубации с 100 нг/мл аспирина. Стрелкой указаны времена добавления CaCl₂, прогестерона (P4) и аспирина (Asp). Общее количество экспериментов для P4 + Asp: $N = 3$. *в, г* – Типичные кальциевые ответы, наблюдаемые в одиночных сперматозоидах человека в ответ на активацию 5 мкМ прогестероном, стрелкой указано время добавления прогестерона (P4). *в* – Типичный одиночный пик с характерным временем 160 ± 44 с. Воспроизведено из работы [15]. Ответило $N_{\text{клеток}} = 36$ из 64. *г* – Типичный вид кальциевых осцилляций. Воспроизведено из работы [15]. Ответило $N_{\text{клеток}} = 18$ из 64.

В случае сперматозоидов мыши в точечной модели существует режим одиночного пика (рис. 3з), а также кальциевые осцилляции с периодом порядка сотен секунд, наблюдаемые в других работах [35]. Как и в случае сперматозоидов человека, в случае сперматозоидов мыши максимальная ширина пика, описываемая одномерной моделью, составляет 40 с (рис. 3з), максимальный период осцилляций — 70 с (рис. 3к), что значительно меньше экспериментально наблюдаемых периода осцилляций и ширины пика.

Трехмерная модель и для сперматозоидов человека, и для сперматозоидов мыши была способна количественно описать ширину пика в ~ 100 с (рис. 3в) и частоту осцилляций (100–300 с) (рис. 3е) при коэффициенте диффузии кальция меньшем, чем $20 \text{ мкм}^2/\text{с}$.

Динамика кальция в сперматозоидах мыши определяется коэффициентом диффузии кальция и пространственной конфигурацией системы. При помощи трехмерной модели кальциевой сигнализации в сперматозоидах мыши нами было проведено теоретическое исследование характера зависимости кальциевого ответа от коэффициента диффузии кальция. Было показано, что система может переключать свой тип ответа с осцилляторного на одиночный пик при изменении коэффициента диффузии кальция (рис. 4а). В сперматозоидах мыши при фиксированном коэффициенте диффузии IP_3 , равном $10 \text{ мкм}^2/\text{с}$, колебания в системе появлялись при коэффициенте диффузии кальция менее $143 \text{ мкм}^2/\text{с}$ (рис. 4а). Наблюдалось, что период осцилляций увеличивался при увеличении коэффициента диффузии кальция (рис. 4а, красная линия). При этом ранее было показано, что в сперматозоидах человека при фиксированном коэффициенте диффузии IP_3 , равном $10 \text{ мкм}^2/\text{с}$, колебания в системе появлялись при коэффициенте диффузии кальция менее $70 \text{ мкм}^2/\text{с}$ [15].

Также мы исследовали влияние пространственного распределения компонентов системы на тип ответа. Мы показали, что наличие осцилляций возможно только при скорости экструзии кальция кальциевой помпой PMCA большей, чем $0.43 \text{ мМ}/\text{с}$ (рис. 4б). Также период осцилляций зависел от V_{PMCA} почти линейно (на рисунке шкала нелинейна), что аналогично сперматозоидам человека [15].

В полной модели предполагалось, что PMCA в сперматозоидах локализована в жгутике. Несмотря на то что ее присутствие в акросоме нельзя исключить, качественно это не меняет ситуацию в модели в силу того, что она в любом случае дублирует там SPCA, параметры которой подбираются; можно

считать, что SPCA в модели отражает суммарную активность SPCA и PMCA в акросоме. При этом в модели для мыши, где PMCA была равномерно распределена, кальциевые колебания исчезли, а ширина одиночного пика уменьшилась до 30 с.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе проводится исследование механизмов кальциевой сигнализации, индуцируемой прогестероном в сперматозоидах мыши. Проводится экспериментальное наблюдение кальциевого ответа суспензии клеток на прогестерон с характерной шириной пика 120 ± 35 с и предотвращение этого ответа ингибитором циклооксигеназы аспирином. Путем компьютерного моделирования доказываем, что в сперматозоидах мыши может работать схема активации прогестероном, включающая синтез промежуточного простаноида и активацию сперматозоида через ассоциированный с G-белком рецептор к данному простаноиду, что существенно отличает схему для сперматозоида мыши от сперматозоида человека. Тем не менее, в рамках данной работы было показано, что возникновение осцилляторного ответа на прогестерон в сперматозоидах мыши также управляется коэффициентом диффузии ионов кальция и распределением управляющих элементов кальциевой сигнализации, как и в сперматозоидах человека.

Наблюдаемая кальциевая сигнализация в сперматозоидах в ответ на прогестерон хорошо соответствует ранее опубликованным данным. Параметры одиночного пика, наблюдаемого в сперматозоидах мыши, также соответствуют параметрам пика, наблюдаемых другими авторами [35], однако в работе из-за того, что микроскопия одиночных клеток мыши не проводилась, кальциевые осцилляции в одиночных клетках не исследовались экспериментально.

В настоящей статье на основе полученных результатов и литературных данных мы предположили, что, хотя у мыши активность прогестерон-чувствительного кальциевого канала CatSper, в отличие от человека, не ингибируется 2-AG, расщепляемым ABHD2, при этом сам ABHD2 так же, как у человека, активируется прогестероном и катализирует производство арахидоновой кислоты [6]. Она конвертируется циклооксигеназой в некоторый простаноид, который активирует G-белковую сигнализацию, что приводит к активации фосфолипазы C и индукции кальциевой сигнализации. Данная схема подтверждается проведенными нами экспериментами с аспирином, а также способностью построенной модели описывать индуцированную

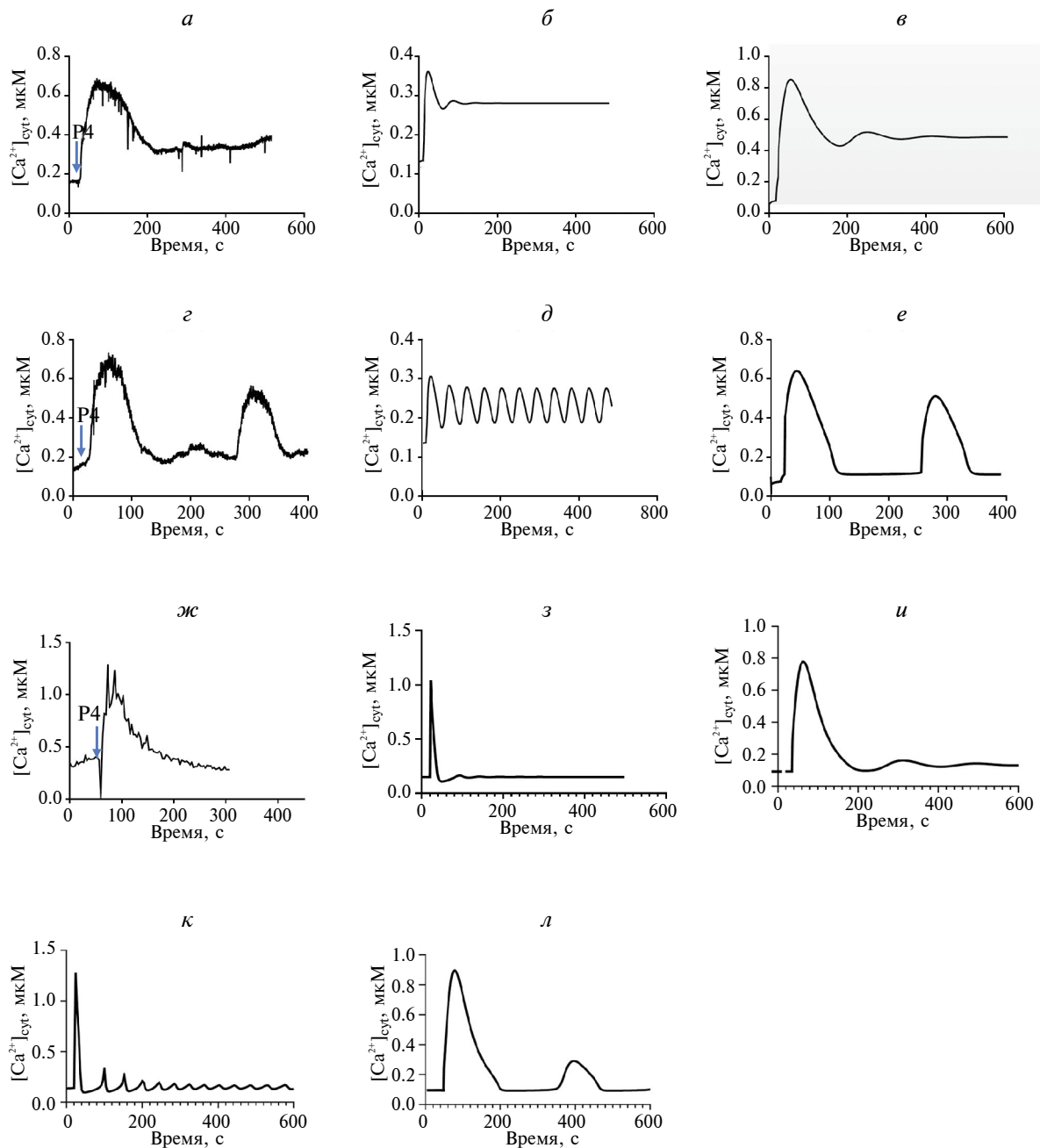


Рис. 3. Сравнение результатов моделирования с экспериментальными данными. *а* – Типичный экспериментально наблюдаемый одиночный пик в сперматозоидах человека в ответ на активацию 5 мкМ прогестерона имеет ширину ~150 с [15]. *б* – Сперматозоид человека, точечная модель. Одиночный пик в точечной модели имеет ширину ~50 с, что значительно меньше наблюдаемого экспериментально. *в* – Сперматозоид человека, трехмерная модель. Одиночный пик в распределенной модели имеет ширину ~150 с, что совпадает с наблюдаемым экспериментально. Представленные зависимости концентраций от времени для трехмерной модели являются усредненными по объему. *г* – Сперматозоид человека. Пример низкочастотных кальциевых осцилляций, наблюдаемых в сперматозоиде человека периодом ~200 с [10]. *д* – Сперматозоид человека, точечная модель. Осцилляции в точечной модели имеют порядок периода ~50 с, что значительно меньше наблюдаемых экспериментально. *е* – Сперматозоид человека, трехмерная модель. Осцилляции в распределенной модели совпадают по периоду с экспериментально наблюдаемыми. *ж* – Типичный кальциевый ответ на активацию 50 мкМ прогестероном в сперматозоидах мыши, ширина пика ~100 с. *з* – Сперматозоид мыши, точечная модель. Одиночный пик в точечной модели имеет максимальную ширину 40 с, что значительно меньше экспериментально наблюдаемой ($k_{PLC} = 180$). *и* – Сперматозоид мыши, трехмерная модель. Одиночный пик в распределенной модели имеет ширину 150 с, что совпадает с экспериментально наблюдаемой ($k_{PLC} = 5000$). *к* – Сперматозоид мыши, точечная модель, вариант осциляторного ответа при значении параметра $k_{PLC} = 90$. *л* – Сперматозоид мыши, распределенная модель, вариант осциляторного ответа при значении параметра $k_{PLC} = 2500$.

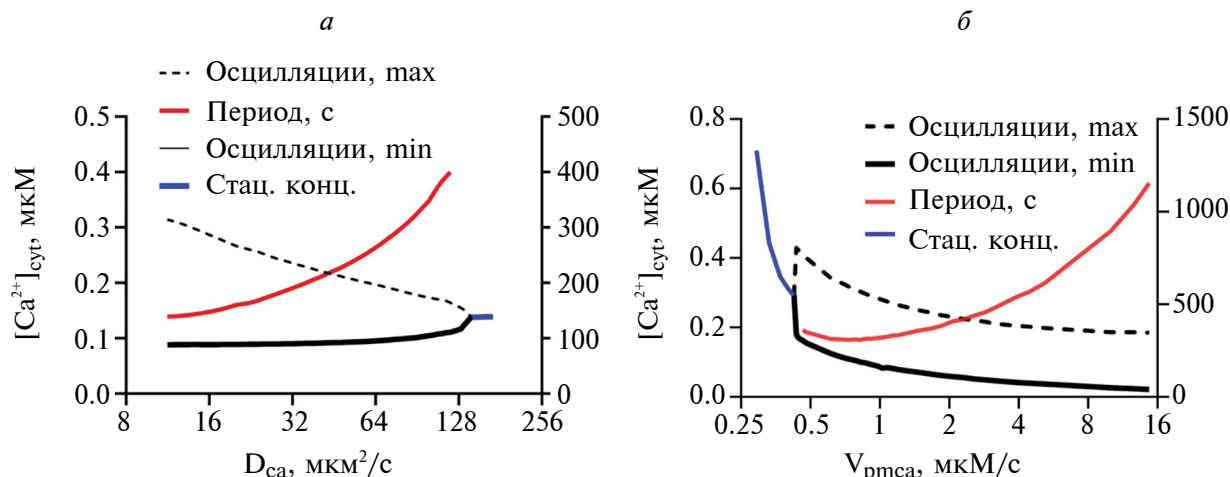


Рис. 4. Теоретическое исследование трехмерной модели кальциевой сигнализации в сперматозоидах мыши. *а* – Вариация коэффициента диффузии кальция D_{Ca} приводит к исчезновению кальциевых осцилляций для более высоких D_{Ca} . Сплошная черная линия – минимум амплитуды осцилляций. Сплошная синяя линия – стационарное значение концентрации кальция (Стац. конц.), режим пика. Штриховая линия – максимум амплитуды кальциевых осцилляций. Красная линия – период кальциевых осцилляций (ось справа). *б* – Наличие осцилляций, их амплитуда и период зависят от V_{PMCA} – максимальной скорости работы РМСА. Сплошная черная линия – минимум амплитуды осцилляций. Штриховая линия – максимум амплитуды кальциевых осцилляций. Синяя линия – стационарная концентрация кальция, режим пика. Красная линия – период кальциевых осцилляций (ось справа).

прогестероном кальциевую сигнализацию в сперматозоидах мыши. Это позволяет нам проводить исследования особенностей кальциевой сигнализации, основной из которых является показанная зависимость осцилляторного ответа от пространственного расположения ферментов и каналов.

Пространственная конфигурация системы влияет как на форму, но и на тип кальциевого ответа. Для сперматозоидов человека мы показали, что при фиксированном коэффициенте диффузии $10 \mu\text{m}^2/\text{s}$, колебания в системе появлялись при коэффициенте диффузии ионов кальция менее $70 \mu\text{m}^2/\text{s}$. В то же время в сперматозоидах мыши колебания в системе появлялись при коэффициенте диффузии ионов кальция менее $143 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Наблюдаемая разница в пороговых коэффициентах диффузии может быть объяснена разницей длин сперматозоидов мыши и человека: $50 \mu\text{m}$ [38] у человека против $130 \mu\text{m}$ у мыши [39].

В существующих гомогенных математических моделях кальциевого ответа в сперматозоидах человека [15, 40] также возникал осцилляторный ответ при некоторых комбинациях параметров. Однако соотношение периода осцилляций и высоты пика в этих моделях не согласовывалось с нашими и литературными данными [41].

Зависимость кальциевой сигнализации от пространственной конфигурации систем находится в соответствие с работами [42, 43], где утверждается,

что динамика кальциевой сигнализации в ацинарных клетках и яйцеклетках *Xenopus laevis* может существенно изменяться при учете диффузии кальция или потока жидкости. Геометрия системы также играет важную роль в дендритных клетках при кальциевом ответе [44].

Таким образом, как в сперматозоиде человека, так и в сперматозоидах мыши важную роль в генерации кальциевого ответа играет пространственная удаленность кальциевого депо и кальциевой АТФ-азы РМСА.

Следует учитывать ограничения использованного подхода. Закон диффузии Фика является приближением, потому что диффузия кальция в клетках носит нелинейный характер [45]. В модели связывание кальция с буферными системами учитывалось только неявно путем низкого (но постоянного) коэффициента диффузии. Ограничением работы является и то, что концентрации кальция измерены для сперматозоидов мыши усредненно, а не для отдельных клеток.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа поддержана грантом РНФ № 23-74-00057. Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова.

Соответствие принципам этики. Данное исследование было одобрено комиссией по биоэтике МГУ имени М.В. Ломоносова (номер заявки 109-ж от 06 марта 2022 года) и проведено в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации.

Дополнение 1. Уравнения и параметры трехмерной компьютерной модели

Д1. Принципы построения модели, выбора начальных и граничных условий и подбор параметров. Трехмерная модель была создана с использованием программного обеспечения VCell (<http://www.vcell.org/>). Соответствующая модель Virtual Cell, MouseSpermCalcium, представлена в открытом доступе на <http://www.vcell.org/> под именем пользователя Juliajessica. Детали геометрии модели представлены в табл. Д1. Геометрия трехмерной модели включает в себя цитозоль сперматозоида (56 мкм³), разделенный на жгутик сперматозоида (0.4 мкм в диаметре, 115 мкм длиной [46]), шейку (0.8 мкм в диаметре [47], 20 мкм длиной [48]) и головку сперматозоида (8 × 3 × 2.5 мкм [48]), акросому сперматозоида, служащую кальциевым депо (1.3 мкм³) [17], расположенную в головке сперматозоида (рис. Д1, табл. Д1), а также клеточную мембрану и мембрану акросомы. Граничные условия второго рода были использованы для всех веществ. Данные о локализации веществ и учете диффузии даны в табл. Д2. Все вещества, находящиеся

в акросоме, считались хорошо перемешанными. Для перевода объемных концентраций и констант диссоциации в поверхностные использовался коэффициент $\omega_q = N_a (V_q / S_q)$, где N_a – число Авогадро, V_q – объем компартмента q, S_q – площадь поверхности компартмента q. ω_{Acr} и ω_{Cyt} соответствуют акросоме и цитозолю.

Д2. Уравнения модели. Обозначения переменных модели указаны в табл. Д2. Обозначения параметров модели указаны в табл. Д4.

Первый модуль состоит из 11 уравнений:

$$\frac{\partial [Progesterone_{in}]}{\partial t} = D_{prog} ([Progesterone] - [Progesterone_{in}]) + D_{prog} \Delta [Progesterone_{in}], \quad (1)$$

$$\frac{\partial [AA]}{\partial t} = \frac{k_{catABHD} [AG][ABHD2^*]}{\omega_{Acr} K_{mABHD-AG} + [AG]} - k_{AA} [AA] - k_{COX} N_{COX} [AA] + D_{AA} \Delta [AA], \quad (2)$$

$$\frac{\partial [PGE2]}{\partial t} = k_{-GPCR} [GPCRact] / \omega_{Cyt} + k_{COX} N_{COX} [AA] / \omega_{Cyt} - k_{-GPCR} [GPCR][PGE2] / (\omega_{Cyt} K_{dGPCR}) - k_{degPGE} [PGE2] + D_{AA} \Delta [PGE2]$$

Таблица Д1. Геометрия модели

Название компартмента	Уравнение, задающее границы компартмента	Обозначение, объем	Обозначение, площадь мембраны	Источник
Акросома	Полуэллипс, заданный следующим уравнением: $(((((0.7 \times x) - (0.7 \times 36.0))^2) + (2.0 \times ((y - 5.0)^2)) + (((2.0 \times z) - 10.0)^2)) < 1.21) \times (x > 34.0) \times (z < 5.0))$	V_{acr} , 1.3 мкм ³	S_{acr} , 9.6 мкм ²	[17]
Цитозоль	Жгутик сперматозоида: цилиндр, заданный уравнением $((x \geq -89.0) \times (x \leq 14.0) \times (((y - 5.0)^2) + ((z - 5.0)^2)) < (0.3^2)))$ Головка сперматозоида: Полуэллипс, заданный уравнением $(((((0.4 \times x) - (0.4 \times 35.0))^2) + (((1.3 \times y) - (1.3 \times 5.0))^2) + (((2.0 \times z) - 10.0)^2)) < 3.0))$ Шейка сперматозоида: Цилиндр, заданный уравнением $((x \geq 14.0) \times (x \leq 34.0) \times (((y - 5.0)^2) + ((z - 5.0)^2)) < (0.4^2)))$	V_{cyt} , 56 мкм ³	S_{cyt} , 283 мкм ²	[49]

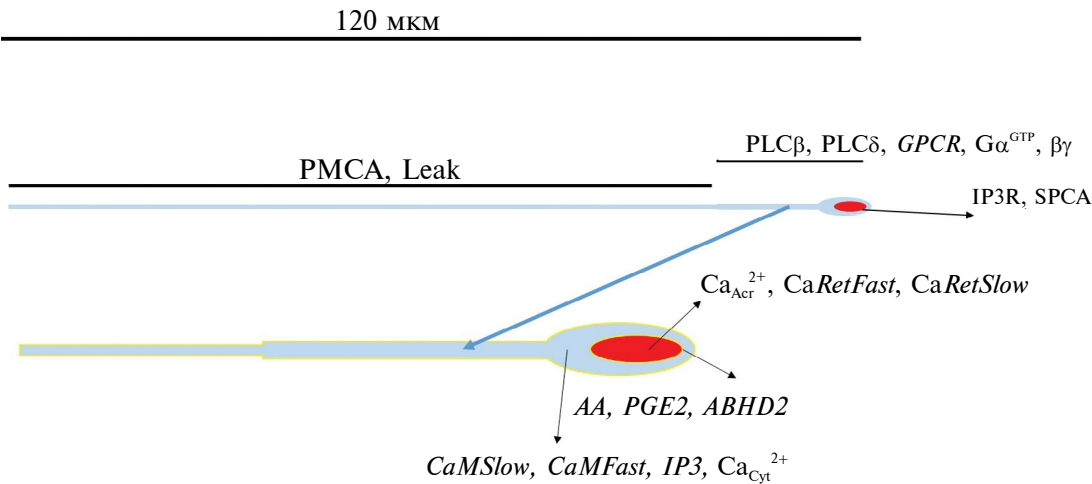


Рис. Д1. Общий вид геометрии модели. Расположение веществ. Пространственное ограничение некоторых реакций. Синяя область – цитозоль сперматозоида. Красная область – акросома сперматозоида. Желтая область – мембрана сперматозоида.

Таблица Д2. Начальные значения переменных (поверхностные концентрации для мембранных веществ, объемные концентрации для растворенных веществ; соответствуют базальным для всего, кроме кальция) и коэффициенты диффузии (для трехмерной модели)

Название вещества	Обозначение переменной	Компартмент	Начальные значения		Коэффициент- диффузии в 3D модели, мкм ² /с		
			Значение	Источник	Обозначение	Значение	Источник
Арахидоновая кислота	[AA]	Мембрана акросомы	0 мкм ⁻²	–	D _{AA}	1	[15]
PGE2	[PGE2]	Цитозоль	0 мкМ	–	D _{AA}	1	[15]
Прогестерон в цитозоли	[Progesterone _{in}]	Цитозоль	0 мкМ	–	D _{Prog}	0.1	Подбор
ABHD2, неактивная	[ABHD2]	Мембрана акросомы	17 мкм ⁻²	[15]	D _{prot}	2	[15]
ABHD2, активная	[ABHD2*]	>>	0 мкм ⁻²	–	D _{prot}	2	[15]
2-AG*	[AG]	>>	1171 мкм ⁻²	См. КОММ.	D _{AA}	1	[15]
β γ-субъединица G-белка	[βγ]	Плазматическая мембрана	0 мкм ⁻²	–	D _{prot}	2	[15]
Активированный GPCR	[GPCRact]	>>	0 мкм ⁻²	–	D _{prot}	2	[15]
Неактивный GPCR**	[GPCR]	>>	111 мкм ⁻²	См. КОММ.	D _{prot}	2	[15]

Таблица Д2. Окончание

α-субъединица G-белка с GTP	$[G\alpha^{GTP}]$	>>	0 мкМ	—	D_{prot}	2	[15]
Кальретикулин, свободный медленный сайт***	$[CaRetSlow]$	Акросома	2.8 мМ	См. КОММ.	—	—	—
Кальретикулин, медленный сайт с кальцием	$[CaRetSlowCa]$	>>	0 мкМ	—	—	—	—
Кальретикулин, свободный быстрый сайт****	$[CaRetFast]$	>>	311 мкМ		—	—	—
Кальретикулин, быстрый сайт с кальцием	$[CaRetFastCa]$	>>	0 мкМ	—	—	—	—
Кальмодулин, свободный медленный сайт*****	$[CaMSlow]$	Цитозоль	4.9 мкМ	См. КОММ.	D_{ca}	10–170	Подбор
Кальмодулин, медленный сайт с кальцием	$[CaMSlowCa]$	>>	0 мкМ	—	D_{ca}	10–170	Подбор
Кальмодулин, свободный быстрый сайт*****	$[CaMFast]$	>>	4.9 мкМ	См. КОММ.	D_{ca}	10–170	Подбор
Кальмодулин, быстрый сайт с кальцием	$[CaMFastCa]$	Цитозоль	0 мкМ	—	D_{ca}	10–170	Подбор
IP ₃	$[IP3]$	>>	0 мкМ	[50]	D_{IP3}	10.0	Подбор
Кальций в цитозоле	$[Ca_{Cyt}^{2+}]$	>>	0.1 мкМ	[51]	D_{ca}	10–170	Подбор
Кальций в акросоме	$[Ca_{Acr}^{2+}]$	Акросома	256 мкМ	[51]	—	—	—
Активированная PLCβ	$[PLC\beta act]$	Плазматическая мембрана	0 мкМ ⁻²	—	D_{prot}	2	[15]
Неактивная PLCβ*****	$[PLC\beta]$	>>	177 мкМ ⁻²	См. КОММ	D_{prot}	2	[15]

* Рассчитывается как $2AG_{Vol0} \times N_a V_{acr} / S_{acr}$. Для $2AG_{Vol0}$ см. табл. Д4.
** Рассчитывается как N_{GPCR} / S_{acr} . Для N_{GPCR} см. табл. Д4.
*** Рассчитывается как $(N_{CaRetSlow}) / (N_a \times V_{acr})$. Для $N_{CaRetSlow}$ см. табл. Д4.
**** Рассчитывается как $(N_{CaRetFast}) / (N_a \times V_{acr})$. Для $N_{CaRetFast}$ см. табл. Д4.
***** Рассчитывается как $(N_{CaMSlow}) / (N_a \times V_{cyt})$. Для $N_{CaMSlow}$ см. табл. Д4.
***** Рассчитывается как $(N_{CaMFast}) / (N_a \times V_{cyt})$. Для $N_{CaMFast}$ см. табл. Д4.
***** Рассчитывается как $N_{PLC\beta} / S_{acr}$. Для $N_{PLC\beta}$ см. табл. Д4.

$$\frac{\partial [ABHD^*]}{\partial t} = k_{+ABHDProg} [ABHD2] [Progesterone_{in}] - k_{-ABHDProg} [ABHD2^*] + D_{Prot} \Delta [ABHD2^*], \quad (4)$$

$$\frac{\partial [AG]}{\partial t} = -\frac{k_{catABHD} [AG] [ABHD2^*]}{\omega_{Acr} K_{mABHD-AG} + [AG]} + k_{AA} [AA] + D_{AA} \Delta [AG], \quad (5)$$

$$\frac{\partial [GPCRact]}{\partial t} = k_{-GPCR} [GPCR] [PGE2] / K_{dGPCR} - k_{-GPCR} [GPCRact] - k_{intern} [GPCRact] + D_{Prot} \Delta [GPCRact], \quad (6)$$

$$\frac{\partial [GPCR]}{\partial t} = -k_{-GPCR} [GPCR] [PGE2] / K_{dGPCR} + k_{-GPCR} [GPCRact] + D_{Prot} \Delta [GPCR], \quad (7)$$

$$\frac{\partial [\beta\gamma]}{\partial t} = k_{diss} [GPCRact] \frac{\omega_{Cyt} M - [\beta\gamma]}{\omega_{Cyt} K_{G2} + (\omega_{Acr} M - [\beta\gamma])} - k_{G1} [\beta\gamma] ([\beta\gamma] - [G\alpha^{GTP}]) + D_{Prot} \Delta [\beta\gamma], \quad (8)$$

$$\frac{\partial [G\alpha^{GTP}]}{\partial t} = k_{diss} [GPCRact] \frac{\omega_{Cyt} M - [\beta\gamma]}{\omega_{Cyt} K_{G2} + (\omega_{Acr} M - [\beta\gamma])} - k_{hydr} \omega_{Cyt} [GAP] \frac{[G\alpha^{GTP}]}{\omega_{Cyt} K_{G3} + [G\alpha^{GTP}]} + D_{Prot} \Delta [G\alpha^{GTP}], \quad (9)$$

$$\frac{\partial [PLC\beta act]}{\partial t} = -[PLC\beta act] k_{DActPLC} + k_a [G\alpha^{GTP}] [PLC\beta] + D_{prot} \Delta [PLC\beta act], \quad (10)$$

$$\frac{\partial [PLC\beta]}{\partial t} = [PLC\beta act] k_{DActPLC} - k_a [G\alpha^{GTP}] [PLC\beta] + D_{prot} \Delta [PLC\beta], \quad (11)$$

Сумма скоростей в правых частях (10) и (11) дает ноль, поэтому для гомогенной системы одно из уравнений можно отбросить.

Полученная система уравнений была упрощена путем исследования иерархии характерных времен и редукции с применением теоремы Тихонова до 9 уравнений. Сначала было произведено обезразмеривание переменных:

$$PLC\beta_s = \frac{[PLC\beta]}{PLC\beta_{avg}}, \quad PLC\beta_{ACTs} = \frac{[PLC\beta act]}{PLC\beta_{ACTavg}},$$

$$\beta\gamma_s = \frac{[\beta\gamma]}{\beta\gamma_{avg}}, \quad G\alpha^{GTP}_s = \frac{[G\alpha^{GTP}]}{G\alpha^{GTP}_{avg}},$$

$$GPCRact_s = \frac{[GPCRact]}{GPCRact_{avg}}, \quad GPCR_s = \frac{[GPCR]}{GPCR_{avg}},$$

$$AG_s = \frac{[AG]}{AG_{avg}}, \quad AA_s = \frac{[AA]}{AA_{avg}}, \quad PGE2_s = \frac{[PGE2]}{PGE2_{avg}},$$

$$ABHD2_s = \frac{[ABHD2]}{ABHD2_{avg}}, \quad ABHD2^*_s = \frac{[ABHD2^*]}{ABHD2^*_{avg}}.$$

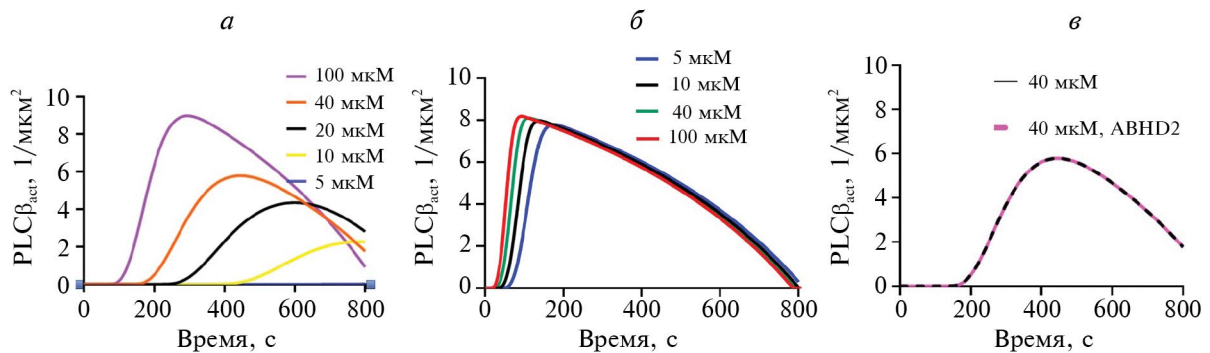


Рис. Д2. Динамика количества активированной фосфолипазы для различных параметров первого модуля модели. *а* – Режим 4 из [34]. *б* – Режим 2 из [34]. *в* – Сравнение полной модели и модели с примененным квазиравновесным приближением для ABHD2.

Значения с индексом $_{avg}$ соответствуют средним за период активации значениям переменных. Численные значения даны в табл. Д3.

В обезразмеренную систему были подставлены численные значения для констант, и она была переписана в виде $dp_s / dt = A^S O(1)$. Полученные значения для коэффициентов A^S соотносились следующим образом: $A^{AA} \ll A^{FG} \sim A^{CaGTP} \ll A^{CaMSlow} \ll A^{GPCR} \ll A^{ABHD2}$. При применении квазистационарного приближения для ABHD2, модель полностью сохраняла свое поведение (рис. Д3в). В конечных расчетах концентрации ABHD2 и ABHD2* задавались следующими выражениями:

$$\begin{aligned} [ABHD2^*] &= [ABHD2]_0 - [ABHD2], \\ [ABHD2] &= k_{-ABHDProg} ([ABHD2]_0) / \\ &/ (k_{+ABHDProg} [Progesterone_{in}] + k_{-ABHDProg}). \end{aligned}$$

Во втором модуле на вход подавалась активность PLC следующим выражением:

$$[PLC\beta_{act}] = 8e^{\frac{-(t-600)^2}{250^2}} / \text{мкМ}^2. \text{ Активность PLC}\delta 4 \text{ описывалась как кальций-зависимый поток IP}_3 \text{ в цитозоль — уравнение (27). Второй модуль состоит из 8 уравнений. Обозначения переменных модели указаны в табл. Д2. Обозначения параметров модели указаны в табл. Д4.}$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial [Ca_{Cyt}^{2+}]}{\partial t} &= J_{Acr,leak} - J_{SPCA} - J_{PMCA} + J_{IP3r} + J_{leak} + \\ &+ J_{BufCyt} + D_{Ca} \Delta [Ca_{Cyt}^{2+}], \end{aligned} \quad (12)$$

$$\frac{d[Ca_{Acr}^{2+}]}{dt} = J_{SPCA} - J_{RNE,leak} - J_{IP3r} + J_{BufER}, \quad (13)$$

$$J_{SPCA} = \begin{cases} \frac{V_{SPCA} [Ca_{Cyt}^{2+}]^2}{K_{SPCA}^2 + [Ca_{Cyt}^{2+}]^2}, & \bar{x} \in \text{Мембрана акросомы} \\ 0, & \bar{x} \notin \text{Мембрана акросомы} \end{cases}, \quad (14)$$

$$J_{PMCA} = \begin{cases} \frac{V_{PMCA} [Ca_{Cyt}^{2+}]^2}{K_{PMCA}^2 + [Ca_{Cyt}^{2+}]^2}, & \bar{x} \in \text{Жгуттик} \\ 0, & \bar{x} \notin \text{Жгуттик} \end{cases}, \quad (15)$$

$$J_{Acr,leak} = \begin{cases} k_{leak} ([Ca_{Acr}^{2+}] - [Ca_{Cyt}^{2+}]), & \bar{x} \in \text{Мембрана акросомы} \\ 0, & \bar{x} \notin \text{Мембрана акросомы} \end{cases}, \quad (16)$$

$$J_{leak} = \begin{cases} k_{leakPP}, & \bar{x} \in \text{Жгуттик} \\ 0, & \bar{x} \notin \text{Жгуттик} \end{cases}, \quad (17)$$

$$J_{IP3r} = \begin{cases} N_{IP3} k_{IP3} P_0 ([Ca_{Acr}^{2+}] - [Ca_{Cyt}^{2+}]), & \bar{x} \in \text{Мембрана акросомы} \\ 0, & \bar{x} \notin \text{Мембрана акросомы} \end{cases}, \quad (18)$$

где $P_0 = m_\infty^3 h^3$ — вероятность пребывания IP3R в открытом состоянии, определяемая согласно модели Ли-Ринзела [52], h — доля каналов, не инактивированных кальцием:

Таблица Д3. Средние по времени значения переменных при активации 50 мкМ прогестерона

Переменная	Среднее значение	Переменная	Среднее значение	Переменная	Среднее значение
$PLC\beta_{avg}$	15 мкМ ⁻²	$PGE2_{avg}$	0.15 мкМ	$[CaRetSlow]$	2500 мкМ
$PLC\beta_{ACTavg}$	6 мкМ ⁻²	$ABHD2_{avg}$	8 мкМ ⁻²	$[CaMFast]$	10 мкМ
$\beta\gamma_{avg}$	33 мкМ ⁻²	$ABHD2^*_{avg}$	6 мкМ ⁻²	$[CaMSlow]$	6 мкМ
$G\alpha^{GTP}_{avg}$	200 мкМ ⁻²	$IP3_{avg}$	0.1 мкМ	$[CaRetFastCa]$	300 мкМ
$GPCRact_{avg}$	13 мкМ ⁻²	$Ca_{Cyt}^{2+}_{avg}$	0.25 мкМ	$[CaRetSlowCa]$	300 мкМ
$GPCR_{avg}$	5 мкМ ⁻²	$Ca_{Acr}^{2+}_{avg}$	10 мкМ	$[CaMFastCa]$	4.5 мкМ
AG_{avg}	0.6 мкМ	$[CaRetFast]$	10 мкМ	$[CaMSlowCa]$	0.8 мкМ

$$\frac{dh}{dt} = \frac{h_{\infty} - h}{\tau_h}, \quad (19)$$

где

$$\tau_h = \frac{1}{a_2 \left(Q_2 + [Ca_{cyt}^{2+}] \right)},$$

$$m_{\infty} = \left(\frac{[IP_3]}{[IP_3] + K_1} \right) \left(\frac{[Ca_{cyt}^{2+}]}{[Ca_{cyt}^{2+}] + K_5} \right), \quad h_{\infty} = \frac{Q_2}{Q_2 + [Ca_{cyt}^{2+}]},$$

$$Q_2 = K_2 \frac{[IP_3] + K_1}{[IP_3] + K_3},$$

$$J_{BufER} = -[CaRetSlow][Ca_{Acr}^{2+}]k_{retS}^+ +$$

$$+ [CaRetSlowCa]k_{retS}^- -$$

$$[CaRetFast][Ca_{Acr}^{2+}]k_{retF}^+ + [CaRetFast]k_{retF}^-, \quad (20)$$

$$J_{BufCyt} = -[CaMSlow][Ca_{Cyt}^{2+}]k_{MS}^+ +$$

$$+ [CaMSlowCa]k_{MS}^- -$$

$$- [CaMFast][Ca_{Cyt}^{2+}]k_{MF}^+ + [CaMFast]k_{MF}^-, \quad (21)$$

где J_{SPCA} — это поток через SPCA, J_{PMCA} — поток через PMCA, J_{IP3r} — поток через $IP3R$, J_{leak} и $J_{RNE, leak}$ — утечки из внешней среды и депо.

$$\frac{d[CaRetSlow]}{dt} = -[CaRetSlow][Ca_{Acr}^{2+}]k_{+CaRetSlow} +$$

$$+ [CaRetSlowCa] \frac{k_{+CaRetSlow}}{K_{dCaRetSlow}}, \quad (22)$$

$$\frac{d[CaRetFast]}{dt} = -[CaRetFast][Ca_{Acr}^{2+}]k_{+CaRetFast} +$$

$$+ [CaRetFastCa] \frac{k_{+CaRetFast}}{K_{dCaRetFast}}, \quad (23)$$

$$\frac{d[CaMFast]}{dt} = -[CaMFast][Ca_{Cyt}^{2+}]k_{+CaMFast} +$$

$$+ [CaMFastCa]k_{-CaMFast}, \quad (24)$$

$$\frac{d[CaMSlow]}{dt} = -[CaMSlow][Ca_{Cyt}^{2+}]k_{+CaMSlow} +$$

$$+ [CaMSlowCa] \frac{k_{+CaMSlow}}{K_{dCaMSlow}}, \quad (25)$$

$$\frac{\partial [IP_3]}{\partial t} = J_{PLC\beta} - J_{IP5pp} + J_{plcd} + D_{IP3} \Delta [IP_3], \quad (26)$$

$$J_{PLC\delta} = \begin{cases} \frac{N_{PLC\delta} k_{PLC} [Ca_{Cyt}^{2+}]}{N_A V_{cyt} \left(K_{PLC} + [Ca_{Cyt}^{2+}] \right)}, & \vec{x} \in \text{Головка+шейка} \\ 0, & \vec{x} \notin \text{Головка+шейка} \end{cases}$$

$$J_{PLC\beta} = \begin{cases} [PLC\beta act] k_{PLC}, & \vec{x} \in \text{Головка+шейка} \\ 0, & \vec{x} \notin \text{Головка+шейка} \end{cases}, \quad (27)$$

$$J_{IP5pp} = \frac{N_{IP5pp} k_{IP5pp} [IP_3]}{N_A V_{cyt} (K_{IP5pp} + [IP_3])}, \quad (29)$$

где J_{IP5pp} — скорость деградации IP_3 инозитол 5-фосфатазой ($IP5pp$), $J_{PLC\delta}$ — скорость производства IP_3 $PLC\delta$; $J_{PLC\beta}$ — скорость производства IP_3 $PLC\beta$.

Полученная система из 8 уравнений была упрощена с помощью исследования иерархии времен путем применения теоремы Тихонова до 7 уравнений. Сначала было произведено обезразмеривание переменных:

$$IP3_s = \frac{[IP_3]}{IP3_{avg}}, \quad Ca_{Cyt s}^{2+} = \frac{[Ca_{Cyt}^{2+}]}{Ca_{Cyt avg}^{2+}}, \quad Ca_{Acr s}^{2+} = \frac{[Ca_{Acr}^{2+}]}{Ca_{Acr avg}^{2+}},$$

$$CaRetSlow_s = \frac{[CaRetSlow]}{CaRetSlow_{avg}},$$

$$CaRetFast_s = \frac{[CaRetFast]}{CaRetFast_{avg}},$$

$$CaMSlow_s = \frac{[CaMSlow]}{CaMSlow_{avg}}, \quad CaMFast_s = \frac{[CaMFast]}{CaMFast_{avg}}$$

Значения с индексом avg соответствуют средним за период активации значениям переменных. Численные значения даны в табл. Д3. В обезразмеренную систему были подставлены численные значения для констант, и уравнения переписаны в виде $dp_s / dt = A^S O(1)$. Результирующие значения для коэффициентов A^S соотносились следующим образом:

$$A^{IP3} \sim A^{CaRetSlow} \sim A^{CaRetFast} \ll A^{CaMSlow} \ll A^{CaRNE} \sim$$

$$\sim A^{CaMFast} \ll A^{CaCyt}$$

При применении квазистационарного приближения для Ca_{Cyt}^{2+} (рис. Д3а), модель расходилась. При применении квазистационарного приближения для Ca_{Acr}^{2+} (рис. Д3б), кальциевый

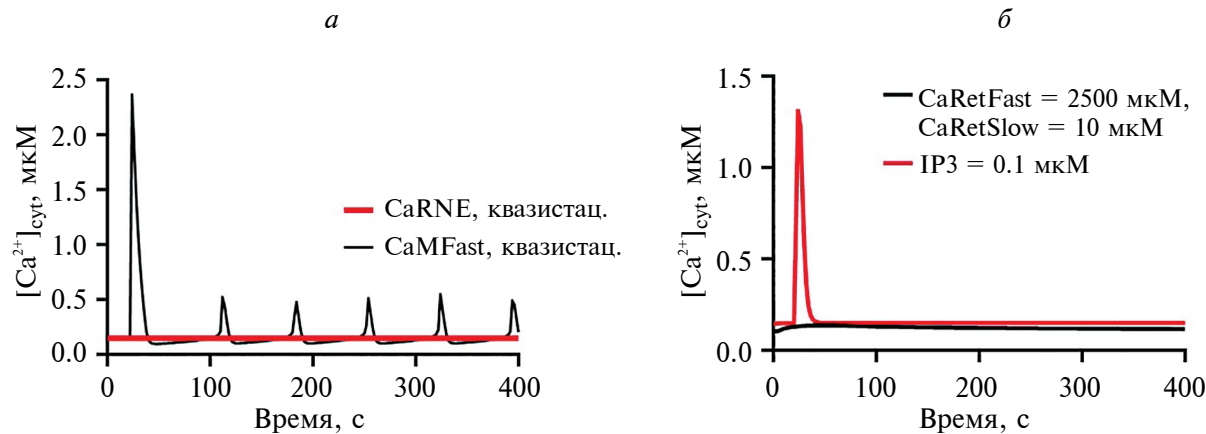


Рис. Д3. Использование квазистационарного и квазиравновесного приближений для второго модуля модели. *а* – При использовании квазистационарного (квазистац.) приближения для концентрации быстрого сайта кальмодулина, кальцевый ответ не меняется (черная кривая). Для кальция в депо при использовании квазистационарного приближения кальцевый ответ отсутствует. *б* – При использовании квазиравновесного приближения для кальре-тикулина, кальцевый ответ отсутствует. При использовании квазистационарного приближения для IP_3 кальцевый ответ сохраняется, но осцилляции в модели отсутствуют при любых значениях концентрации IP_3 .

Таблица Д4. Параметры модели

	Значение	Ссылка	Комментарий
Кальцевый модуль			
$K1$	0.13 μM	[53]	Параметр IP_3R
$K2$	30 μM	[54]	Параметр IP_3R
$K3$	0.003 μM	[54]	Параметр IP_3R
$K5$	0.13 μM	[54]	Параметр IP_3R
a_2	10^{-4}	[54]	Параметр IP_3R
V_{SPCA}	2.31 $\mu M/s$	Подбор параметров	Максимальная скорость SPCA
K_{SPCA}	0.27 μM	[55]	Аффинность SPCA к кальцию
k_{leak}	0,01	Подбор параметров	Коэффициент утечки из акросомы
k_{IP3}	$0.00007 (\mu M \times c)^{-1}$	[56]	Поток через 1 открытый IP_3R
k_{leakPP}	0.15 $\mu M/s$	[55]	Утечка кальция в цитозоль
K_{PLC}	0.7 μM	[57]	Аффинность к кальцию PLC_δ
k_{PLC}	$5000 c^{-1}$	[58]	Каталитическая константа PLC_δ и PLC_β
$N_{PLC\delta}$	15	Метод оценки описан в [15] на основе [59]	Количество PLC_δ
$N_{PLC\beta}$	140	[59]	Количество PLC_β
N_{IP3}	1850	Метод оценки описан в [15] на основе [59]	Количество IP_3R

Таблица Д4. Продолжение

N_{IP5pp}	240	Метод оценки описан в [15] на основе [59]	Количество IP5pp
$k_{catIp5pp}$	340 c^{-1}	[60]	Каталитическая константа IP5pp
K_{Ip5pp}	0.7 мкМ	[61]	Аффинность IP5PP к IP ₃
N_{CaRet}	54000	Метод оценки описан в [15] на основе [59]	Количество CaRet
$N_{CaRetSlow}$	$N_{CaRetSlow} \times 18$	[62]	Емкость сайта С кальретикулина
$N_{CaRetFast}$	$N_{CaRetSlow} \times 2$	[62]	Емкость сайта Р кальретикулина
$k_{+CaRetSlow}$	$0.1 (\text{мкМ} \times \text{c})^{-1}$	[63]	Скорость ассоциации сайта С с кальцием
$K_{dCaRetSlow}$	2000 мкМ	[63]	Константа диссоциации сайта С и кальция
$k_{+CaRetFast}$	0.05	[15]	Скорость ассоциации сайта Р с кальцием
$K_{dCaRetFast}$	1 мкМ	[64]	Константа диссоциации сайта Р и кальция
N_{CaM}	54000	Метод оценки описан в [15] на основе [59]	Количество молекул кальмодулина
$N_{CaMSlow}$	$N_{CaM} \times 2$	[63]	Емкость сайта N кальмодулина
$N_{CaMFast}$	$N_{CaM} \times 2$	[63]	Емкость сайта С кальмодулина
$k_{+CaMSlow}$	10 c^{-1}	[65]	Скорость ассоциации сайта С кальмодулина с кальцием
$K_{dCaMSlow}$	1 мкМ	[63]	Константа диссоциации сайта С кальмодулина и кальция
$k_{+CaMFast}$	$100 (\text{мкМ} \times \text{c})^{-1}$	[65]	Скорость ассоциации сайта N кальмодулина с кальцием
$k_{-CaMFast}$	500 c^{-1}	[65]	Скорость диссоциации сайта N кальмодулина с кальцием
V_{PMCA}	1 мкМ	[66]	Максимальная скорость PMCA
K_{PMCA}	0.27 мкМ	[67]	Константа полуактивации PMCA
Модуль ABHD2–PLCβ			
$k_{catABHD}$	0.35	[68]	Каталитическая константа для ABHD2
$K_{mABHD-AG}$	12 мкМ	[69]	Аффинность ABHD2 к 2-AG
$k_{+ABHDProg}$	3	[15]	k_{+} для связывания прогестерона и ABHD2
$K_{mABHDProg}$	16	[6]	Аффинность ABHD2 к прогестерону
k_{AA}	0.01	[6]	Скорость генерации 2-AG мембраной
N_{gpcr}	400	Метод оценки описан в [15] на основе [59]	Начальное количество молекул ABHD2
k_{diss}	25 c^{-1}	[34]	Параметр активации GPCR

Таблица Д4. Окончание

k_{G1}	10^{-6} с^{-1}	[34]	Параметр активации GPCR
M	0.5 мкМ	[34]	Полная концентрация GPCR
K_{G2}	0.5 мкМ	[34]	Параметр активации GPCR
K_{G3}	0.002 мкМ	[34]	Параметр активации GPCR
$[GAP]$	0.025 мкМ	[34]	Концентрация GAP в клетке
k_{hydr}	5	[34]	Параметр активации GPCR
$k_{DActPLC}$	1 с^{-1}	Подбор параметров	Скорость деактивации PLCβ
k_a	$5 (\text{мкМ} \times \text{с})^{-1}$	Подбор параметров	Скорость активации PLC β α ^{GTP} -субъединицей
k_{intern}	0.01 с^{-1}	[34]	Скорость интернализации активированного G-белка
$2AG_{Vol0}$	0.7 мкМ	[6]	Начальная объемная концентрация 2-AG
k_{COX}	$5.9 (\text{мкМ} \times \text{с})^{-1}$	[70]	Скорость конвертации АА в PGE2 циклооксигеназой
N_{COX}	400	[59]	Количество циклооксигеназы в сперматозоиде
k_{degPGE}	0.006 с^{-1}	[71]	Скорость деградации PGE2
k_{-GPCR}	1 с^{-1}	Подбор параметров	Скорость диссоциации PGE2 и GPCR
K_{dGPCR}	0.001 мкМ	[72]	Константа диссоциации комплекса PGE2-GPCR

ответ на прогестерон отсутствовал. Аналогичный результат был получен для использования стационарного приближения для CaRetFast и CaRetSlow (рис. Д3б). В случае использования стационарного приближения для IP3, ответ наблюдался в полной мере, однако модель не была способна воспроизводить кальциевые осцилляции (рис. Д3б). Использование квазистационарного приближения для быстрого сайта кальмодулина не меняло вид кальциевого ответа, и далее данное приближение использовалось как для гомогенной, так и трехмерной модели.

Квазистационарное приближение для быстрого сайта кальмодулина было задано следующим образом:

$$[CaMFastCa] = [CaMFast]_0 - [CaMFast],$$

$$[CaMFast] = k_{-CaMFast} [CaMFast]_0 / \left(\left[Ca_{Cyt}^{2+} \right] k_{+CaMFast} + k_{-CaMFast} \right).$$

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ottolini M., Sonkusare S.K. 2021. The calcium signaling mechanisms in arterial smooth muscle and endothelial cells. *Compr. Physiol.* **11** (2), 1831–1869.

2. Kalyanasundaram A., Li N., Hansen B.J., Zhao J., Fedorov V.V. 2019. Canine and human sinoatrial node: Differences and similarities in the structure, function, molecular profiles, and arrhythmia. *J. Vet. Cardiol.* **22**, 2–19.

3. Suarez S.S., Ho H.C. 2003. Hyperactivation of mammalian sperm. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. **49** (3), 351–356.
4. Sanchez-Cardenas C., Servin-Vences M.R., Jose O., Trevino C.L., Hernandez-Cruz A., Darszon A. 2014. Acrosome reaction and Ca^{2+} imaging in single human spermatozoa: New regulatory roles of $[\text{Ca}^{2+}]_i$. *Biol. Reprod.* **91** (3), 67.
5. Taraborrelli S. 2015. Physiology, production and action of progesterone. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **94** Suppl 161, 8–16.
6. Miller M.R., Mannowetz N., Iavarone A.T., Safavi R., Gracheva E.O., Smith J.F., Hill R.Z., Bautista D.M., Kirichok Y., Lishko P.V. 2016. Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via the sex hormone progesterone. *Science*. **352** (6285), 555–559.
7. Nakamura Y., Fukami K. 2009. Roles of phospholipase C isozymes in organogenesis and embryonic development. *Physiology (Bethesda)*. **24**, 332–341.
8. Kim Y.H., Park T.J., Lee Y.H., Baek K.J., Suh P.G., Ryu S.H., Kim K.T. 1999. Phospholipase C-delta1 is activated by capacitative calcium entry that follows phospholipase C-beta activation upon bradykinin stimulation. *J. Biol. Chem.* **274** (37), 26127–26134.
9. Finkelstein M., Etkovitz N., Breitbart H. 2020. Ca^{2+} signaling in mammalian spermatozoa. *Mol. Cell Endocrinol.* **516**, 110953.
10. Alasmari W., Barratt C.L., Publicover S.J., Whalley K.M., Foster E., Kay V., Martins da Silva S., Oxenham S.K. 2013. The clinical significance of calcium-signalling pathways mediating human sperm hyperactivation. *Hum. Reprod.* **28** (4), 866–876.
11. Schuh K., Cartwright E.J., Jankevics E., Bundschu K., Liebermann J., Williams J.C., Armesilla A.L., Emerson M., Oceandy D., Knobloch K.P., Neyses L. 2004. Plasma membrane Ca^{2+} ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. *J. Biol. Chem.* **279** (27), 28220–28226.
12. Harper C., Wootton L., Michelangeli F., Lefievre L., Barratt C., Publicover S. 2005. Secretory pathway Ca^{2+} -ATPase (SPCA1) Ca^{2+} pumps, not SERCAs, regulate complex $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signals in human spermatozoa. *J. Cell Sci.* **118** (Pt 8), 1673–1685.
13. Si Y., Olds-Clarke P. 2000. Evidence for the involvement of calmodulin in mouse sperm capacitation. *Biol. Reprod.* **62** (5), 1231–1239.
14. Nakamura M., Oshio S., Tamura A., Okinaga S., Arai K. 1992. Antisera to calreticulin inhibits sperm motility in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186** (2), 984–990.
15. Korobkin J., Balabin F.A., Yakovenko S.A., Simonenko E.Y., Sveshnikova A.N. 2021. Occurrence of calcium oscillations in human spermatozoa is based on spatial signaling enzymes distribution. *Int. J. Mol. Sci.* **22** (15), 8018.
16. Rennhack A., Schiffer C., Brenker C., Fridman D., Nitao E.T., Cheng Y.M., Tamburrino L., Balbach M., Stolting G., Berger T.K., Kierzek M., Alvarez L., Wachten D., Zeng X.H., Baldi E., Publicover S.J., Kaupp U.B., Strunker T. 2018. A novel cross-species inhibitor to study the function of CatSper Ca^{2+} channels in sperm. *Br J Pharmacol.* **175** (15), 3144–3161.
17. Herrick S.B., Schweissinger D.L., Kim S.W., Bayan K.R., Mann S., Cardullo R.A. 2005. The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *J. Cell Physiol.* **202** (3), 663–671.
18. Pietrobon E.O., Soria M., Dominguez L.A., Monclus Mde L., Fornes M.W. 2005. Simultaneous activation of PLA2 and PLC are required to promote acrosomal reaction stimulated by progesterone via G-proteins. *Mol. Reprod. Dev.* **70** (1), 58–63.
19. Herrero M.B., Cebal E., Franchi A., Motta A., Gimeno M.F. 1998. Progesterone enhances prostaglandin E2 production via interaction with nitric oxide in the mouse acrosome reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **252** (2), 324–328.
20. Joyce C.L., Nuzzo N.A., Wilson L., Jr., Zaneveld L.J. 1987. Evidence for a role of cyclooxygenase (prostaglandin synthetase) and prostaglandins in the sperm acrosome reaction and fertilization. *J. Androl.* **8** (2), 74–82.
21. Lishko P.V., Botchkina I.L., Kirichok Y. 2011. Progesterone activates the principal Ca^{2+} channel of human sperm. *Nature*. **471** (7338), 387–391.
22. Breyer R.M., Bagdassarian C.K., Myers S.A., Breyer M.D. 2001. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**, 661–690.
23. Gao D.D., Lan C.F., Cao X.N., Chen L., Lei T.L., Peng L., Xu J.W., Qiu Z.E., Wang L.L., Sun Q., Huang Z.Y., Zhu Y.X., Zhou W.L., Zhang Y.L. 2022. G protein-coupled estrogen receptor promotes acrosome reaction via regulation of Ca^{2+} signaling in mouse spermdagger. *Biol. Reprod.* **107** (4), 1026–1034.
24. Kawai T., Miyata H., Nakanishi H., Sakata S., Morioka S., Sasaki J., Watanabe M., Sakimura K., Fujimoto T., Sasaki T., Ikawa M., Okamura Y. 2019. Polarized PtdIns(4,5) P(2) distribution mediated by a voltage-sensing phosphatase (VSP) regulates sperm motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **116** (51), 26020–26028.
25. Choi D., Lee E., Hwang S., Jun K., Kim D., Yoon B.K., Shin H.S., Lee J.H. 2001. The biological significance of phospholipase C beta 1 gene mutation in mouse sperm in the acrosome reaction, fertilization, and embryo development. *J. Assist. Reprod. Genet.* **18** (5), 305–310.
26. Fukami K., Yoshida M., Inoue T., Kurokawa M., Fissore R.A., Yoshida N., Mikoshiba K., Takenawa T. 2003. Phospholipase Cdelta4 is required for Ca^{2+} mobilization essential for acrosome reaction in sperm. *J. Cell Biol.* **161** (1), 79–88.
27. Ohlmann P., Hechler B., Cazenave J.P., Gachet C. 2004. Measurement and manipulation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in suspensions of platelets and cell cultures. *Methods Mol. Biol.* **273**, 229–250.

28. Mirabito Colafella K.M., Neuman R.I., Visser W., Danser A.H.J., Versmissen J. 2020. Aspirin for the prevention and treatment of pre-eclampsia: A matter of COX-1 and/or COX-2 inhibition? *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **127** (2), 132–141.
29. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260** (6), 3440–3450.
30. Bergmann F.T., Hoops S., Klahn B., Kummer U., Mendes P., Pahle J., Sahle S. 2017. COPASI and its applications in biotechnology. *J. Biotechnol.* **261**, 215–220.
31. Hoops S., Sahle S., Gauges R., Lee C., Pahle J., Simus N., Singhal M., Xu L., Mendes P., Kummer U. 2006. COPASI—a COMplex PATHway SIMulator. *Bioinformatics.* **22** (24), 3067–3074.
32. Moraru, II, Schaff J.C., Slepchenko B.M., Blinov M.L., Morgan F., Lakshminarayana A., Gao F., Li Y., Loew L.M. 2008. Virtual Cell modelling and simulation software environment. *IET Syst. Biol.* **2** (5), 352–362.
33. Marhl M., Schuster S., Brumen M., Heinrich R. 1997. Modeling the interrelations between the calcium oscillations and ER membrane potential oscillations. *Biophys. Chem.* **63** (2–3), 221–239.
34. Katanaev V.L., Chornomorets M. 2007. Kinetic diversity in G-protein-coupled receptor signalling. *Biochem. J.* **401** (2), 485–495.
35. Romarowski A., Sanchez-Cardenas C., Ramirez-Gomez H.V., Puga Molina Ldel C., Trevino C.L., Hernandez-Cruz A., Darszon A., Buffone M.G. 2016. A specific transitory increase in intracellular calcium induced by progesterone promotes acrosomal exocytosis in mouse sperm. *Biol. Reprod.* **94** (3), 63.
36. Klonowski W. 1983. Simplifying principles for chemical and enzyme reaction kinetics. *Biophys. Chem.* **18** (2), 73–87.
37. Lopez-Gonzalez I., Torres-Rodriguez P., Sanchez-Carranza O., Solis-Lopez A., Santi C.M., Darszon A., Trevino C.L. 2014. Membrane hyperpolarization during human sperm capacitation. *Mol. Hum. Reprod.* **20** (7), 619–629.
38. Smith D., Gaffney E., Blake J., Kirkman-Brown J. 2009. Human sperm accumulation near surfaces: a simulation study. *J. Fluid Mechanics.* **621**, 289–320.
39. Cummins J.M., Woodall P.F. 1985. On mammalian sperm dimensions. *J. Reprod. Fertil.* **75** (1), 153–175.
40. Simons J., Fauci L. 2018. A model for the acrosome reaction in mammalian sperm. *Bull Math Biol.* **80** (9), 2481–2501.
41. Kirkman-Brown J.C., Barratt C.L., Publicover S.J. 2004. Slow calcium oscillations in human spermatozoa. *Biochem. J.* **378** (Pt 3), 827–832.
42. Lechleiter J., Girard S., Clapham D., Peralta E. 1991. Subcellular patterns of calcium release determined by G protein-specific residues of muscarinic receptors. *Nature.* **350** (6318), 505–508.
43. Vera-Siguenza E., Pages N., Rugis J., Yule D.I., Sneyd J. 2019. A mathematical model of fluid transport in an accurate reconstruction of parotid acinar cells. *Bull. Math. Biol.* **81** (3), 699–721.
44. Bell M., Bartol T., Sejnowski T., Rangamani P. 2019. Dendritic spine geometry and spine apparatus organization govern the spatiotemporal dynamics of calcium. *J. Gen. Physiol.* **151** (8), 1017–1034.
45. Zador A., Koch C. 1994. Linearized models of calcium dynamics: formal equivalence to the cable equation. *J. Neurosci.* **14** (8), 4705–4715.
46. Weber K., Waletzky A., Fendl D., Ordóñez P., Takawale P., Hein F., Riedel W., König A., Kunze M., Leoni A.L., Rivera J., Quirici R., Romano I., Paepke S., Okazaki Y., Hardisty J.F. 2014. New method for sperm evaluation by 3-dimensional laser scanning microscopy in different laboratory animal species. *Int. J. Toxicol.* **33** (5), 353–361.
47. Sunanda P., Panda B., Dash C., Padhy R.N., Routray P. 2018. An illustration of human sperm morphology and their functional ability among different group of subfertile males. *Andrology.* **6** (5), 680–689.
48. Albrechtova J., Albrecht T., Dureje L., Pallazola V.A., Pialek J. 2014. Sperm morphology in two house mouse subspecies: Do wild-derived strains and wild mice tell the same story? *PLoS One.* **9** (12), e115669.
49. Yeung C.H., Anapolski M., Cooper T.G. 2002. Measurement of volume changes in mouse spermatozoa using an electronic sizing analyzer and a flow cytometer: validation and application to an infertile mouse model. *J. Androl.* **23** (4), 522–528.
50. Dickinson G.D., Ellefsen K.L., Dawson S.P., Pearson J.E., Parker I. 2016. Hindered cytoplasmic diffusion of inositol trisphosphate restricts its cellular range of action. *Sci. Signal.* **9** (453), ra108.
51. Samtleben S., Jaepel J., Fecher C., Andreska T., Rehberg M., Blum R. 2013. Direct imaging of ER calcium with targeted-esterase induced dye loading (TED). *J. Vis. Exp.* (75), e50317.
52. Li Y.X., Rinzel J. 1994. Equations for InsP_3 receptor-mediated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations derived from a detailed kinetic model: A Hodgkin-Huxley like formalism. *J. Theor. Biol.* **166** (4), 461–473.
53. De Young G.W., Keizer J. 1992. A single-pool inositol 1,4,5-trisphosphate-receptor-based model for agonist-stimulated oscillations in Ca^{2+} concentration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89** (20), 9895–9899.
54. Cai X., Li X., Qi H., Wei F., Chen J., Shuai J. 2016. Comparison of gating dynamics of different $\text{IP}(3)$ R channels with immune algorithm searching for channel parameter distributions. *Phys. Biol.* **13** (5), 056005.
55. Li L.F., Xiang C., Zhu Y.B., Qin K.R. 2014. Modeling of progesterone-induced intracellular calcium signaling in human spermatozoa. *J. Theor. Biol.* **351**, 58–66.
56. Vais H., Foskett J.K., Mak D.O. 2010. Unitary Ca^{2+} current through recombinant type 3 InsP_3 receptor

- channels under physiological ionic conditions. *J. Gen. Physiol.* **136** (6), 687–700.
57. Olson S.D., Suarez S.S., Fauci L.J. 2010. A model of CatSper channel mediated calcium dynamics in mammalian spermatozoa. *Bull. Math. Biol.* **72** (8), 1925–1946.
 58. Kadamur G., Ross E.M. 2013. Mammalian phospholipase C. *Annu. Rev. Physiol.* **75**, 127–154.
 59. Wang M., Weiss M., Simonovic M., Haertinger G., Schrimpf S.P., Hengartner M.O., von Mering C. 2012. PaxDb, a database of protein abundance averages across all three domains of life. *Mol. Cell. Proteomics.* **11** (8), 492–500.
 60. De Pitta M., Goldberg M., Volman V., Berry H., Ben-Jacob E. 2009. Glutamate regulation of calcium and IP3 oscillating and pulsating dynamics in astrocytes. *J. Biol. Phys.* **35** (4), 383–411.
 61. Sims C.E., Allbritton N.L. 1998. Metabolism of inositol 1,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate by the oocytes of *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* **273** (7), 4052–4058.
 62. Baksh S., Michalak M. 1991. Expression of calreticulin in *Escherichia coli* and identification of its Ca²⁺ binding domains. *J. Biol. Chem.* **266** (32), 21458–21465.
 63. Means S., Smith A.J., Shepherd J., Shadid J., Fowler J., Wojcikiewicz R.J., Mazel T., Smith G.D., Wilson B.S. 2006. Reaction diffusion modeling of calcium dynamics with realistic ER geometry. *Biophys. J.* **91** (2), 537–557.
 64. Michalak M., Corbett E.F., Mesaali N., Nakamura K., Opas M. 1999. Calreticulin: One protein, one gene, many functions. *Biochem. J.* **344** (Pt 2), 281–292.
 65. Hoffman L., Chandrasekar A., Wang X., Putkey J.A., Waxham M.N. 2014. Neurogranin alters the structure and calcium binding properties of calmodulin. *J. Biol. Chem.* **289** (21), 14644–14655.
 66. Wennemuth G., Babcock D.F., Hille B. 2003. Calcium clearance mechanisms of mouse sperm. *J. Gen. Physiol.* **122** (1), 115–128.
 67. Lytton J., Westlin M., Burk S.E., Shull G.E., MacLennan D.H. 1992. Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J. Biol. Chem.* **267** (20), 14483–14489.
 68. Vila A., Rosengarth A., Piomelli D., Cravatt B., Marnett L.J. 2007. Hydrolysis of prostaglandin glycerol esters by the endocannabinoid-hydrolyzing enzymes, monoacylglycerol lipase and fatty acid amide hydrolase. *Biochemistry.* **46** (33), 9578–9585.
 69. Tyukhtenko S., Karageorgos I., Rajarshi G., Zvonok N., Pavlopoulos S., Janero D.R., Makriyannis A. 2016. Specific inter-residue interactions as determinants of human monoacylglycerol lipase catalytic competency: A role for global conformational changes. *J. Biol. Chem.* **291** (6), 2556–2565.
 70. Liu Y., Roth J.P. 2016. A revised mechanism for human cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* **291** (2), 948–958.
 71. Hwa J., Martin K. 2017. The Eicosanoids: Prostaglandins, Thromboxanes, Leukotrienes, & Related Compounds. In: *Basic & Clinical Pharmacology*. 14th ed. Ed. Katzung B.G. New York: McGraw-Hill Education.
 72. Marshall F.H., Patel K., Lundstrom K., Camacho J., Foord S.M., Lee M.G. 1997. Characterization of [³H]-prostaglandin E₂ binding to prostaglandin EP₄ receptors expressed with Semliki Forest virus. *Br.J. Pharmacol.* **121** (8), 1673–1678.

Comparative Investigation of the Mechanisms of Calcium Response in Human and Murine Spermatozoa

© 2024 г. J. D. Korobkina^{1,*}, M. A. Panteleev^{1–3}, A. N. Sveshnikova^{1–3}

¹Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 109029 Russia

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

³Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: juliajessika@gmail.com

Calcium signaling is a principal method of signal transduction in cells of non-excitabile tissues. In both mouse and human sperm, it can be induced in response to progesterone, manifesting as oscillations or single peaks and followed by the acrosomal reaction. However, the molecular mechanisms of progesterone activation may vary between species. In this study, we aim to compare the calcium signaling mechanisms in human and mouse spermatozoa. We investigated the calcium response in mouse sperm activated by

progesterone. We employed spectrofluorometry to quantify the rise in calcium concentration in response to progesterone in Fura-2 loaded mouse sperm cells in suspension. Our experiments demonstrated that mouse sperm cells respond to 50 μM progesterone with a peak 120 ± 35 s wide and 0.8 ± 0.3 μM high. Based on literature data, a scheme for the induction of calcium signaling was constructed, suggesting an intermediate stage with the synthesis of a certain prostanoid (possibly PGE₂) and activation of mouse sperm by this prostanoid through a G-protein-coupled receptor. Based on the obtained reaction scheme, two computational models were developed: a point model and a three-dimensional model. As with human sperm, the point model provided only a qualitative description of calcium responses, whereas the three-dimensional model produced the shape of the calcium peak and the frequency of calcium oscillations in response to progesterone that were similar to the experimentally obtained values. Using *in silico* analysis, it was shown that in mouse sperm, the spatial distribution of signaling enzymes regulates the type and form of the calcium response. We conclude that the presence of time delays due to the diffusion and spatial distribution of calcium signaling enzymes regulates the calcium response in both human and mouse sperm.

Keywords: calcium signaling, intracellular signaling, computer modeling, progesterone